



TITLE:

Genomic and transcriptional studies on hydrogenogenic carboxydophilic bacteria(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Fukuyama, Yuto

CITATION:

Fukuyama, Yuto. Genomic and transcriptional studies on hydrogenogenic carboxydophilic bacteria. 京都大学, 2019, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21812>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により全文は2021-06-07に公開

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	福山 宥斗
論文題目	Genomic and transcriptional studies on hydrogenogenic carboxydophilic bacteria (水素生成型一酸化炭素資化性菌におけるゲノム及び転写動態に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>一酸化炭素 (CO) は多くの生物にとって有毒である。しかし水素生成型CO資化性菌は、COをエネルギー・炭素源として増殖し、代謝産物として次世代エネルギーである水素を生成する。そのため、このような微生物を触媒として利用する応用研究が注目されている。本菌のCO代謝において、複数のCOデヒドロゲナーゼ (CODH) が同一遺伝子クラスター上の遺伝子と共役することで中心的な役割を果たすことが知られている。中でも水素生成型ヒドロゲナーゼ (ECH) と複合体を形成するCODHは、CO酸化と化学量論的に等量な水素生成を共役させる。そのような背景の中、本研究では火山性陸上熱水環境より水素生成型CO資化性好熱細菌<i>Carboxydotherrmus pertinax</i>(至適増殖温度65 °C、pH6.0-6.5)の分離に成功した。本菌のCO代謝は不均衡であり、本属内で唯一CO酸化とチオ硫酸還元が共役可能である。加えて本属細菌には、非水素生成型CO資化性菌も報告されており、CO代謝を介したエネルギー保存法の多様性が示唆された。そこで、本属細菌の比較ゲノム解析及び本菌のCO代謝時における網羅的転写解析により水素生成を伴うCO代謝の解明を行った。</p>			
1. CO資化性 <i>Carboxydotherrmus</i> 属細菌の比較ゲノム解析			
<p>次世代シーケンサーMiSeqを用いて<i>C. pertinax</i>及び<i>Carboxydotherrmus islandicus</i>のドラフトゲノムを決定した。さらに、ゲノム情報が利用可能な<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>及び<i>Carboxydotherrmus ferrireducens</i>と併せて、本属細菌4種の全ゲノムを用いた比較ゲノム解析を行った。</p> <p>本属細菌は2.39-2.47 Mbpのゲノムを有し、それらの基本情報は類似していた。本属細菌内のCO代謝を介したエネルギー保存方法を評価するため、CODH遺伝子クラスターを比較した。CO酸化と共役した水素生成能を持たない<i>C. ferrireducens</i>はCODH-ECH遺伝子クラスターを完全に欠失しており、本遺伝子クラスターの有無はCO酸化水素生成能と一致した。しかし、<i>C. pertinax</i>は、本遺伝子クラスター上のCODH-I遺伝子及びその転写調節因子であるCooA遺伝子の両方を欠失していた。</p> <p>既に完全長ゲノムが解読されている<i>C. hydrogenoformans</i>に対するシンテニープロットを作成した結果、ゲノム再編による複数個所のシンテニーの崩壊が<i>C. pertinax</i>にのみ認められた。その主要な領域の一つとしてECH遺伝子クラスターが認められ、本遺伝子クラスターの両端に位置したCODH-I及びCooA遺伝子が遺伝子逆位により欠失したと考えられた。</p> <p>次にCODH-I遺伝子に代替するCODH遺伝子を特定するため、CO代謝関連遺伝子を標的とした定量PCRを行った。その結果本種が有する4つのCODH遺伝子のうちCODH-II遺伝子の転写量のみが大きく上方制御されており、異なる遺伝子クラスター上のCODH-IIとECHが共役する新規なCO代謝を見出した。</p> <p>さらにチオ硫酸還元と共役したCO代謝の詳細を明らかにするために、100%CO雰囲気下のチオ硫酸添加・無添加における増殖の性状を比較した。チオ硫酸添加区において、増殖速度や細胞密度はそれぞれ1.5倍、3.1倍に上昇した。一方で、CO消費量及び水素生成量はそれぞれ0.7倍、0.6倍に低下した。また消費したCOに対する水素の生成</p>			

量の割合も0.9倍に低下していた。以上より、本菌はCO酸化と共役した水素生成のみならず、高効率なチオ硫酸還元を同時に共役させる新規なCO代謝を行うと考えられた。

2. *C. pertinax*における網羅的転写解析

次世代DNAシーケンサーMiSeqを用いて、CO代謝時及び従属栄養増殖時の両条件における遺伝子転写量を網羅的に比較し、有意に転写量が増減した遺伝子 (Differential expression gene, DEG) を同定した。本菌が有する2,577遺伝子のうち、CO代謝時に高発現した遺伝子は36個、従属栄養増殖時に高発現した遺伝子は64個であった。CO代謝時に高発現した遺伝子のうち、85%の遺伝子は9個の遺伝子クラスターにコードされていた。これらの遺伝子クラスターにはCODH-II遺伝子クラスターとECH遺伝子クラスターに加えて、TCA回路においてリンゴ酸とコハク酸間の反応を触媒する酵素群やLys Rタイプ転写調節因子を含む遺伝子クラスターが認められた。それらの上流配列を解析したところ、既知CO感知型転写調節因子CooAのDNA結合領域はECH遺伝子クラスターの上流にのみ認められた。そのため他の遺伝子クラスターは、新規なCOに応答した転写調節機構あるいは既知のCOに応答した転写制御の代謝産物により制御されるCOの副次的な転写調節下にあると推察された。一方、従属栄養増殖時に高発現した遺伝子のうち、91%の遺伝子は14個の遺伝子クラスターにコードされていた。これらの遺伝子クラスターには、溶原ウイルス領域やFe (II) イオンの輸送を担う遺伝子を含む遺伝子クラスターが含まれていた。そのため、従属栄養増殖時に本菌の溶原ファージが溶菌サイクルに移行したと考えられ、CO代謝が本菌に好適であることが示唆された。加えて、嫌気呼吸に必須なヘムタンパク質に含有されるFe (II) を生体内に取り込み、従属栄養増殖時に嫌気呼吸によるエネルギー保存を行うと推察された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

水素生成型CO₂資化性菌は、微生物触媒化によるバイオ水素生産のみならず、環境中においてもCO₂を除去し他の微生物のエネルギー源となる水素を供給する重要な微生物である。そのため、水素生成を伴うCO₂代謝を理解するための研究は非常に重要である。本論文では、ゲノム解析や網羅的転写解析といったオミックス解析により、本性状菌の水素生成を伴うCO₂代謝を明らかにしている。本論文の主な成果は3点に大別できる。

(1) 水素生成型CO₂資化性菌2種のゲノムを新規に解読し、*Carboxydotherrmus*属内で比較ゲノム解析を行った。その結果、*C. pertinax*は、水素生成を伴うCO₂代謝をおこなうものの、そのゲノム上では水素生成型ヒドロゲナーゼ (ECH) と複合体を形成するCO₂デヒドロゲナーゼ (CODH) を欠くことを示した。さらに、遺伝子発現量解析により、本菌は物理的に距離の離れたCODHとECHによる新規な水素生成を伴うCO₂代謝を見出した。

(2) 水素生成型CO₂資化性菌*C. pertinax*の気相CO₂雰囲気下において、チオ硫酸塩を添加した試験区で増殖試験を行った。本菌はチオ硫酸塩添加区において、より少ないCO₂の消費量で細胞を効率的に増殖させていた。以上より、CO₂酸化と共役した水素生成のみならず、高効率なチオ硫酸還元を同時に共役させる新規なCO₂代謝を見出した。

(3) CO₂代謝・従属栄養増殖時における網羅的転写解析により、少数の遺伝子クラスター単位の転写変動によりCO₂代謝が駆動し、CO₂に応答して嫌気呼吸関連酵素の一部の転写量を抑制する一方で、物理的に距離の離れたCODHとECHによる水素生成を伴うCO₂代謝によってエネルギー保存を行うことを見出した。

以上のように、本論文は水素生成型CO₂資化性菌のゲノム特性や生理について新知見を提供するものであり、微生物学、ゲノム微生物学、およびバイオテクノロジーの発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 31年 2月 12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)